



УДК 577.113.4

© 1990 г.

И. Г. Царев, А. А. Мустаев, Е. Ф. Зайчиков,
Т. Ю. Аликина*, А. Г. Веняминава*, М. Н. Репкова*

ВЫСОКОСЕЛЕКТИВНОЕ МЕЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕ-
РАЗЫ *E. COLI* С ПРОМОТОРОМ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫМИ
ПРОИЗВОДНЫМИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ-ЗАТРАВОК
РАЗЛИЧНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ

Лимнологический институт СО АН СССР, Иркутск;

* Новосибирский институт биорганической химии СО АН СССР

Для изучения участка связывания продукта РНК-полимеразы *E. coli* применена техника высокоселективного аффинного мечения, включающая в себя ковалентную модификацию комплекса фермент—промотор Т7А2 реакционноспособными производными олигонуклеотидов, комплементарных промотору, с последующей элонгацией ковалентно присоединенного олигонуклеотида радиоактивным субстратом. Для мечения использованы различные олигонуклеотиды длиной от 2 до 8 звеньев, содержащие алкилирующие, фосфорилирующие и альдегидные группировки. Показано, что мечению подвергаются (и, следовательно, принимают участие в связывании с продуктом) β -, β' - и σ -субъединицы РНК-полимеразы, а также ДНК. Анализ зависимостей картин мечения от длины олигонуклеотида, химической специфичности и структуры реакционноспособных группировок позволил построить схематическую модель участка связывания РНК-продукта в транскрипционном комплексе.

Несколько лет назад для изучения функциональной топографии РНК-полимераз был предложен новый подход, основанный на эндокаталитическом аффинном мечении активного центра [1]. В работах [2, 3] мы применили этот подход для исследования участка связывания продукта РНК-полимеразы *E. coli*. При этом использовались реакционноспособные производные олигонуклеотидов, комплементарных промотору А2. Процедура мечения (как и в случае мононуклеотидных производных [1]) состояла из двух стадий: 1) модификация РНК-полимеразы в комплексе с промотором аффинным реагентом — производным олигонуклеотида; 2) «проявление» активного центра при достройке расположенного в нем олигонуклеотидного остатка радиоактивным субстратом (схема 1).

Схема 1

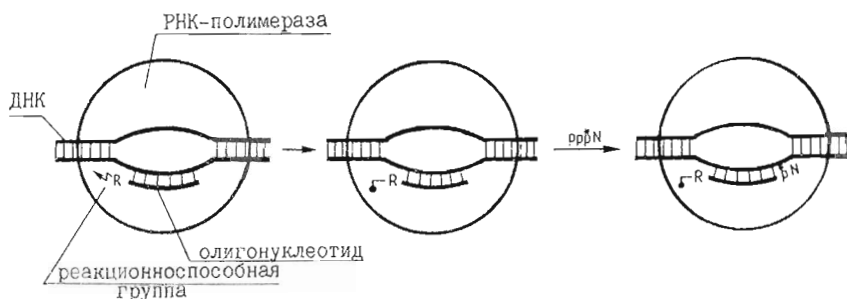


Схема аффинного мечения РНК-полимеразы

Анализ мишеней мечения РНК-полимеразы фосфорилирующими производными олигонуклеотидов, комплементарных промотору А2 фага

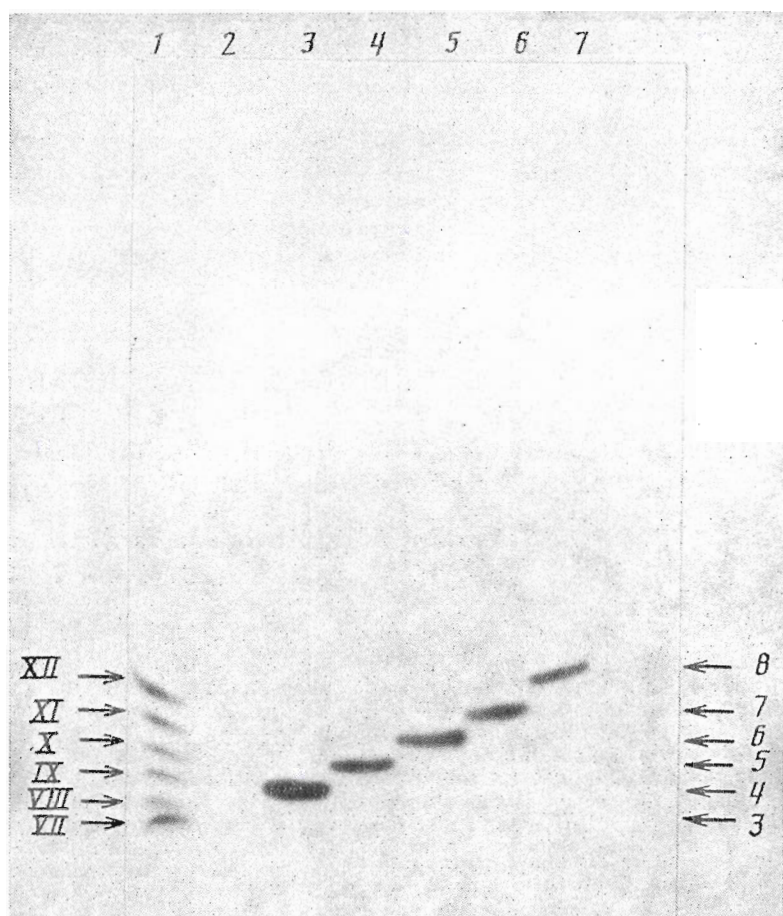


Рис. 1. Изучение затравочных свойств олигонуклеотидов (VII)—(XII). Односубстратную элонгацию с использованием $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ и анализ продуктов электрофорезом в 25% ПААГ проводили как описано в «Экспер. части». Представлена автордиограмма геля. Дорожка 1 — смесь $[5'\text{-}^{32}\text{P}]$ олигонуклеотидов (римские цифры слева — их обозначения). Дорожки 2—7 — эксперименты с олигонуклеотидами (VII), (VIII), (IX), (X), (XI) и (XII) соответственно (арабские цифры обозначают длины радиоактивных продуктов односубстратной элонгации)

T7 [2, 3], позволил составить некоторое представление о топографии участка связывания продукта. Очевидно, что использование для мечения аффинных реагентов, различающихся не только длиной олигонуклеотидной части, но и специфичностью реакционноспособных группировок, позволило бы более подробно прозондировать этот функционально важный участок фермента. В данном сообщении обобщены результаты аффинного мечения, полученные с использованием фосфорилирующих, алкилирующих и альдегидсодержащих производных олигонуклеотидов-затравок.

Изучение затравочных свойств олигонуклеотидов

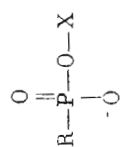
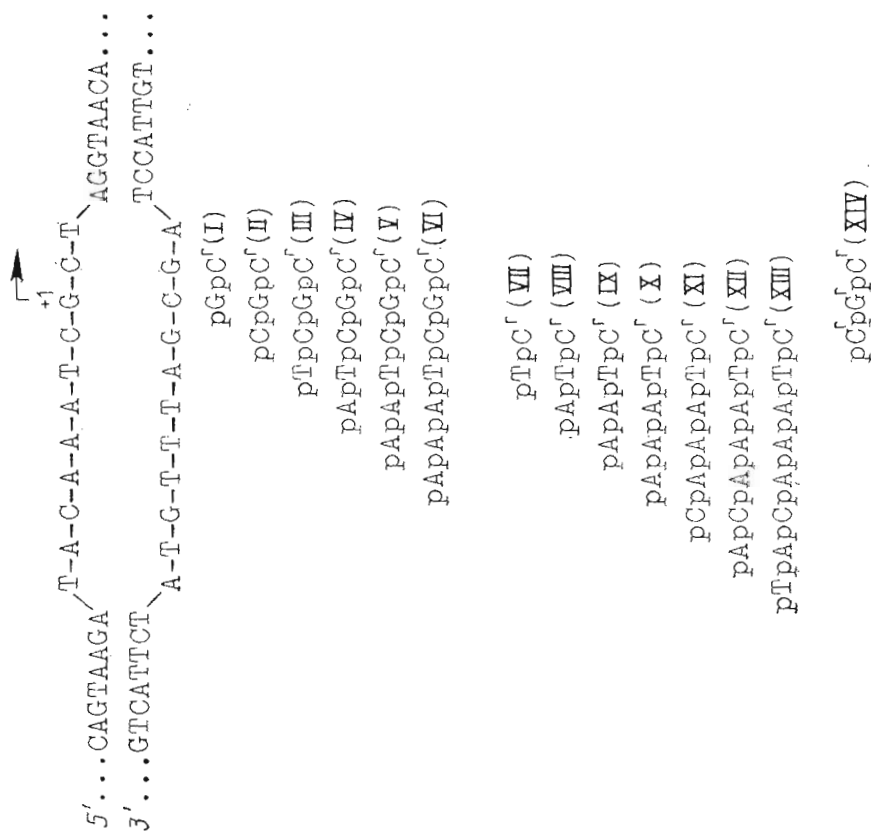
В качестве основы для синтеза аффинных реагентов в данной работе были использованы две серии олигонуклеотидов, комплементарных промотору A2 (схема 2A): 1) олигонуклеотиды (I)—(VI) и (XIV), 3'-звено которых комплементарно нуклеотиду +2 промотора A2; 2) олигонуклеотиды (VII)—(XIII) с 3'-концевым звеном, комплементарным нуклеотиду —1 промотора A2*. Ранее было показано, что олигонуклеотиды

* В состав олигонуклеотидов (I)—(XIII) входит единственное 3'-концевое рибонуклеотидное звено. Как показано в работе [4], такие олигонуклеотиды обладают большей затравочной активностью по сравнению с олигонуклеотидами, составленными исключительно из дезоксирибонуклеотидных звеньев.

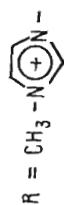
Спектральные отношения для исходных олигонуклеотидов и их производных при рН 7 в водном растворе

Олигонуклеотид	250/260				280/260				290/260				310/260	330/260	
	исх.	Alk ¹	Ald ¹	Ald ²	исх.	Alk ¹	Ald ¹	Ald ²	исх.	Alk ¹	Ald ¹	Ald ²	Alk ²	Alk ¹	Ald ¹
AAATCGC ^r	0,86	0,92	0,92	—	0,53	0,56	0,53	—	0,18	0,21	0,20	—	—	0,43	0,45
AATCGC ^r	0,86	0,93	0,93	—	0,57	0,57	0,59	—	0,19	0,24	0,26	—	—	0,50	0,49
ATCGC ^r	0,86	0,94	0,93	0,90	0,63	0,64	0,66	0,61	0,24	0,29	0,31	0,33	0,07	0,57	0,51
TCGC ^r	0,89	1,00	1,01	—	0,78	0,81	0,80	—	0,31	0,44	0,41	—	—	0,78	0,81
CGC ^r	0,98	1,06	1,09	1,00	0,79	0,84	0,78	0,63	0,34	0,48	0,50	0,28	0,08	0,94	1,07
TACAAATC ^r	0,79	0,83	—	—	0,52	0,53	—	—	0,16	0,15	—	—	—	0,36	—
ACAAATC ^r	0,81	0,84	—	—	0,56	0,52	—	—	0,19	0,17	—	—	—	0,41	—
CAAAATC ^r	0,83	0,82	—	—	0,50	0,54	—	—	0,12	0,23	—	—	—	0,51	—
AAATC ^r	0,80	0,84	—	—	0,46	0,51	—	—	0,12	0,24	—	—	—	0,56	—
AATC ^r	0,76	0,84	—	—	0,45	0,59	—	—	0,41	0,28	—	—	—	0,61	—
ATC ^r	0,74	0,85	—	—	0,50	0,68	—	—	0,10	0,32	—	—	—	0,81	—

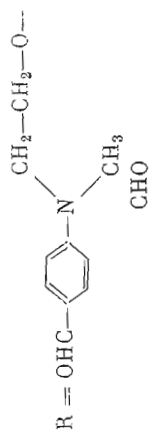
A



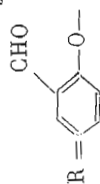
X — остаток олигонуклеотида

MeIm

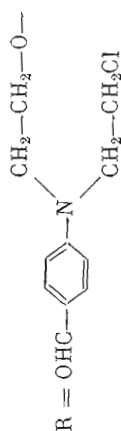
0A

Ald¹

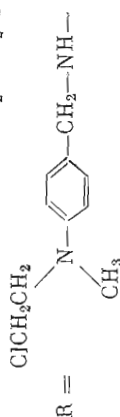
10A

Ald²

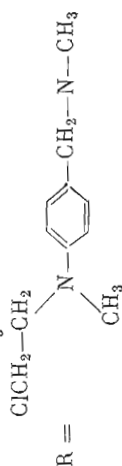
5A

Alk¹

6A

Alk²

9A

Alk³

9A

первой серии, а также олигонуклеотид (XIII) могут служить затравками для синтеза РНК с промотора A2 [4]. На рис. 1 представлены данные, свидетельствующие о том, что олигонуклеотиды (VII)—(XII) второй серии удлиняются на одно звено при инкубации с РНК-полимеразой, промотором A2 и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ и, следовательно, также обладают затравочными свойствами. Таким образом, можно утверждать, что все изображенные на схеме 2 олигонуклеотиды эффективно связываются с бинарным комплексом [РНК-полимераза·промотор] и могут быть использованы для получения аффинных реагентов.

Синтез аффинных реагентов

Аффинные реагенты получали путем присоединения реакционноспособных группировок к 5'-фосфату олигонуклеотидов (I)—(XIV) (структуры реакционноспособных группировок приведены на схеме 2Б).

Для получения производных MeIm- и Alk^{2,3}-типов применяли активацию фосфата смесью дипиридилдисульфида и трифенилфосфина с последующим взаимодействием с метилимидазолом или соответствующим хлорэтиламином (см. [5]).

Соединения Ald¹- и Alk¹-типов получали путем прямого алкилирования 5'-концевого фосфата олигонуклеотидов соответствующим хлорэтиламином. При этом наряду с алкилированием концевого фосфата наблюдалось множественное алкилирование азотистых оснований олигонуклеотидов, степень которого значительно возрастала с увеличением длины олигонуклеотида. Выделение целевого продукта из сложной смеси проводили в помощью обращенно-фазовой хроматографии (см., например, рис. 2).

Соединения Ald²-типа синтезировали взаимодействием MeIm-производного 5'-фосфата (см. выше) с *o*-гидроксibenзальдегидом [6]. Этот метод обеспечивает высокую селективность введения реакционноспособных группировок по концевому фосфату, а также большие (до 60—80%) выходы целевого продукта.

Структуры полученных реагентов доказаны с помощью различных методов. УФ-спектры реагентов Ald¹, Ald^{1,2} (табл. 1) отвечают суммам спектров соответствующих олигонуклеотидов и реакционноспособных группировок. Спектры соединений Ald^{1,2}- и Alk¹-типов после обработки боргидридом натрия изменяются в соответствии с превращением ароматических аминоальдегидов в ароматические аминоспирты (уменьшение поглощения в области 290—350 нм и увеличение в области 260 нм). Наличие в составе реагентов группировок Alk¹-, Alk²- и Alk³-типов показано по способности этих реагентов алкилировать тиофенол. Наличие заместителей при 5'-фосфате реагентов Alk²- и Alk³-типов, присоединенных через фосфамидные связи, следует из превращения этих соединений в исходные олигонуклеотиды после инкубации при pH 2. Реагенты MeIm-типа превращаются в исходные олигонуклеотиды как при кислых, так и при нейтральных pH. В случае реагентов Ald¹- и Alk¹-типов наличие заместителя при 5'-фосфате следует из их устойчивости к действию щелочной фосфатазы. Селективность введения заместителей по 5'-фосфату в случае Ald¹- и Alk¹-производных доказана с помощью обработки их фосфодиэстеразой змеиного яда: в продуктах гидролиза отсутствуют модифици-

А — первичные структуры промоторного участка A2 (вверху) и комплементарных ему олигонуклеотидов. C[†] и G[†] — рибонуклеотидные звенья олигонуклеотидов. Стрелкой показана точка инициации (+1); Б — структуры реакционноспособных группировок реагентов. X — остатки олигонуклеотидов (I)—(XIV). Правый столбец — радиусы действия реакционноспособных группировок (отсчет — от атома фосфора)

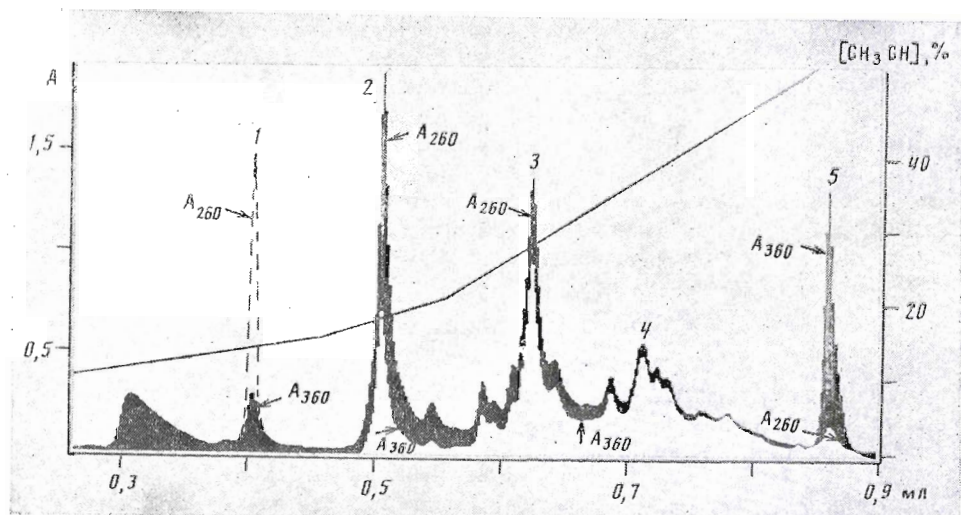


Рис. 2. Хроматограмма реакционной смеси при очистке Ald¹-производного олигонуклеотида (IV) на хроматографе «Милихром». Хроматографию проводили на колонке (2 × 62 мм) с Nucleosil C18, используя градиент концентрации ацетонитрила в растворе 0,05 M LiClO₄ — 1,5 mM ацетат натрия (pH 7,5); детекция при 260 и 360 нм. 1 — исходный олигонуклеотид (IV); 2 — продукт алкилирования концевого фосфата олигонуклеотида (IV) (Ald¹-производное); 3 — продукт двойного алкилирования олигонуклеотида (IV) (по концевому фосфату и по гетероциклическому основанию); 4 — продукт тройного алкилирования олигонуклеотида (IV) (1 моль/моль по концевому фосфату + 2 моль/моль по гетероциклическим основаниям); 5 — исходный 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегид

рованные нуклеотиды, за исключением нуклеотида, соответствующего 5'-концевому звену. Чистота полученных реагентов, определенная микроколоночной хроматографией, составляла не менее 95%.

По химической специфичности реагенты, представленные на схеме 2, можно подразделить на фосфорилирующие (MeIm), альдегидные (Ald¹, Ald²) и алкилирующие (Alk², Alk³). Реагенты MeIm-типа способны фосфорилировать нуклеофильные остатки аминокислот (в первую очередь лизина и гистидина). Альдегидные группы реагентов Ald¹, Ald² реагируют с белками, образуя основания Шиффа с ε-аминогруппами остатков лизина. Алкилирующие реагенты типа Alk² и Alk³ взаимодействуют с различными нуклеофильными аминокислотными остатками, предпочтительно с цистеином и гистидином. Соединения типа Alk¹ обладают двойственной реакционной способностью, так как содержат как альдегидную, так и алкилирующую группировки. При этом алкилирующая группировка активируется после восстановления альдегидной группы боргидридом натрия, что дает возможность «запускать» эти группировки поочередно. Можно было ожидать, что применение реагентов с различной химической специфичностью даст более полную информацию об участке связывания продукта.

Аффинное мечение РНК-полимеразы

Аффинное мечение проводили как описано ранее [2, 3] для MeIm-производных олигонуклеотидов (I)–(VI). MeIm-производные олигонуклеотиды (VII)–(XIII) дают картины (рис. 3) относительного мечения субъединиц, сходные с наблюдавшимися в случае MeIm-производных олигонуклеотидов (I)–(VI) [2, 3]. Это означает, что структура комплекса [РНК-полимераза · ДНК · олигонуклеотид] практически не зависит от сдвига олигонуклеотида на два звена относительно матрицы (по крайней мере с точностью до разрешающей способности метода). Картина мечения ка-

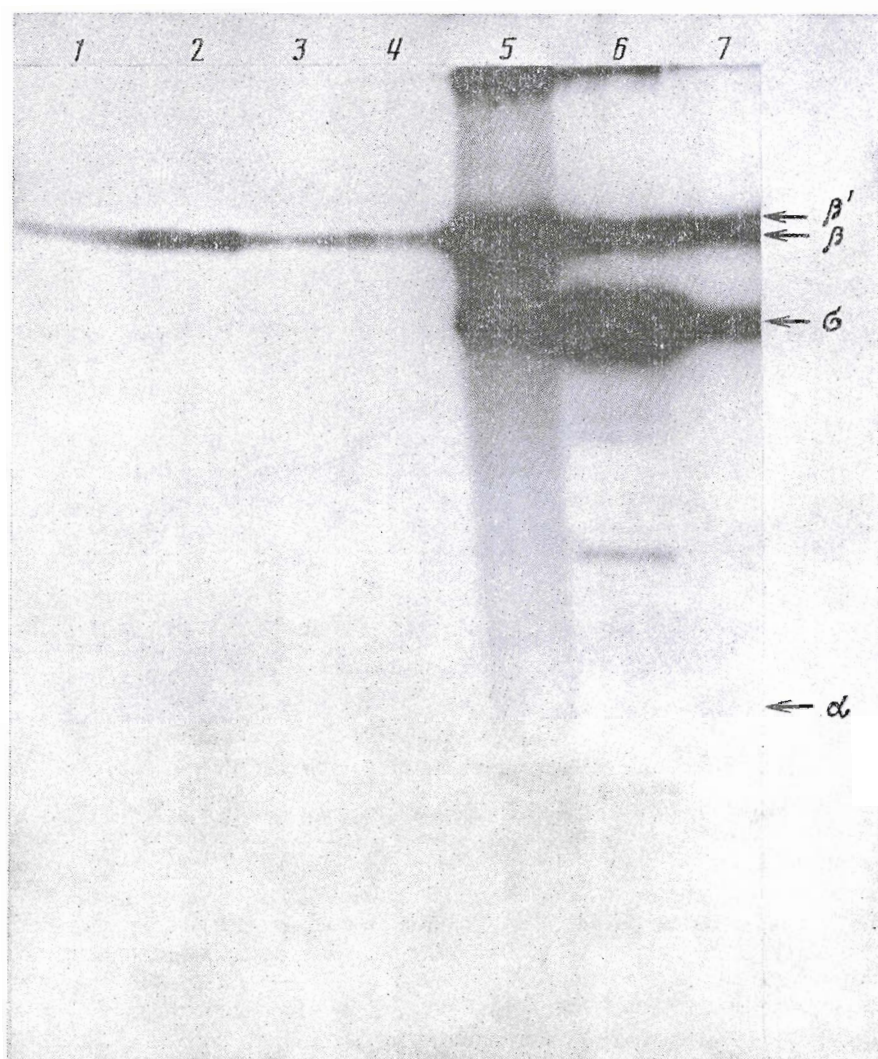


Рис. 3. Аффинное мечение РНК-полимеразы MeIm-производными олигонуклеотидов (VII) (дорожка 1), (VIII) (2), (IX) (3), (X) (4), (XI) (5), (XII) (6) и (XIII) (7). Элонгацию проводили с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$. Электрофорез в 12% ПААГ

чественно не меняется и при замене MeIm-производного тринуклеотида (II) на соответствующее производное тринуклеотида (XIV), имеющего ту же первичную структуру, но состоящего исключительно из рибонуклеотидных звеньев (рис. 4, табл. 2). Это свидетельствует о том, что дезоксирибонуклеотиды с 3'-концевым рибонуклеотидным звеном достаточно хорошо моделируют природные рибоолигонуклеотидные затравки.

Альдегидсодержащие реагенты Ald¹-типа дают картины мечения субъединиц, качественно сходные с таковыми для фосфорилирующих реагентов (рис. 5, табл. 3). Наиболее эффективны производные тринуклеотида, метящие исключительно β -субъединицу. При увеличении длины олигонуклеотида степень мечения β -субъединицы падает, хотя для производного гексануклеотида наблюдается небольшой рост интенсивности мечения. При длине олигонуклеотида 5—7 звеньев начинают метиться β' - и σ -субъединицы (хотя относительная степень мечения σ -субъединицы в случае альдегидных реагентов значительно ниже, чем в случае фосфорилирующих).

Результаты аффинного мечения алкилирующими реагентами существ-

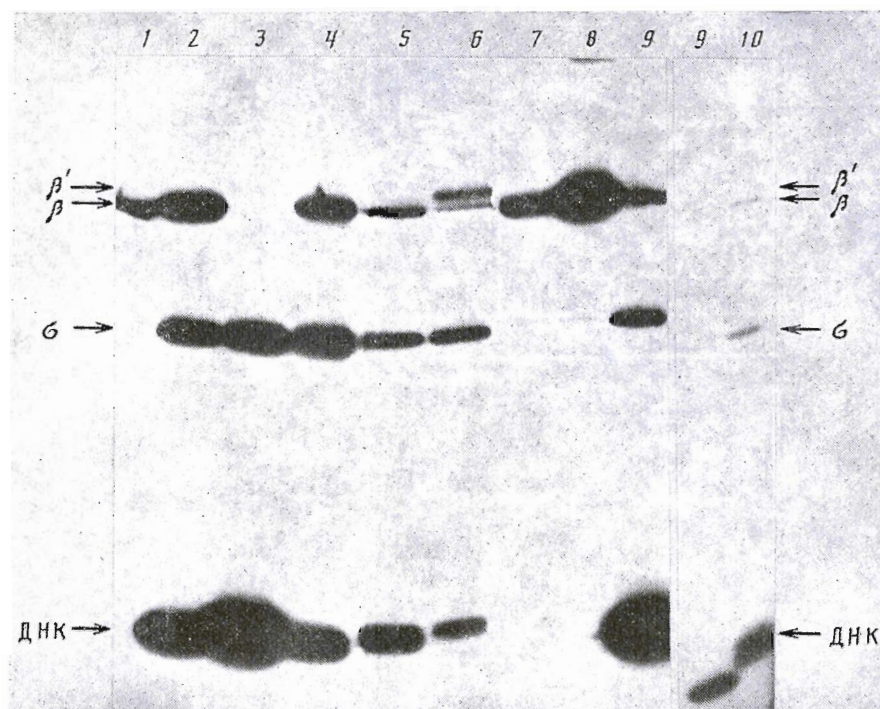


Рис. 4. Аффинное мечение транскрипционного комплекса Alk^2 -производным олигонуклеотида (II) (дорожка 1), Alk^1 -производными олигонуклеотидов (II) (2), (III) (3), (IV) (4), (V) (5), (VI) (6); MeIm -производными олигонуклеотидов (XIV) (7), (II) (8); Alk^2 -производными олигонуклеотидов (II) (9) и (IV) (10). Элонгацию проводили с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Электрофорез в градиентном (6–20%) ПААГ

венно отличаются от описанных выше. В случае реагентов Alk^1 -типа * наблюдается два выраженных максимума мечения β -субъединицы для три- и пентануклеотидов (рис. 4, 2–6); степень мечения производными тетра- и пентануклеотида в 15–25 раз ниже (табл. 2). Такая резкая зависимость степени мечения от длины олигонуклеотида при достаточно близком расположении реакционноспособной группы относительно 5'-концевого фосфата ($<6 \text{ \AA}$) позволяет предположить, что производные три- и пентануклеотидов метят разные участки β -субъединицы.

В случае реагентов Alk^3 -типа имеется только один характерный максимум мечения β -субъединицы для пентануклеотида (рис. 6, табл. 3). Отсутствие второго максимума, возможно, объясняется стерическими затруднениями (из-за большого размера группировки), препятствующими алкилированию нуклеофильных остатков в непосредственной близости к третьему нуклеотидному звену.

В случае как Alk^1 -, так и Alk^2 -реагентов при длине олигонуклеотида 6–7 звеньев наблюдается мечение β' -субъединицы (рис. 4, дорожки 2–6; рис. 6). Для σ -субъединицы имеется выраженный максимум мечения обоими типами реагентов при длине олигонуклеотида 4–5 звеньев (рис. 4, 6).

В случае Alk^2 -реагентов результаты получены только для производных три- и пентануклеотидов (рис. 4, 9, 10). Качественно они полностью соответствуют результатам мечения аналогичными производными Alk^3 -типа.

Особенностью алкилирующих реагентов является также мечение ДНК, обнаруженное ранее [7] для производных Alk^2 -типа. Зависимости

* Оказалось, что результаты мечения реагентами Alk^1 -типа не изменяются, если непосредственно перед добавлением к РНК-полимеразе провести восстановление реагента боргидридом натрия. Это свидетельствует о том, что реализуется только алкилирующая функция реагентов.

Результаты аффинного мечения * транскрипционного комплекса с помощью реагентов MeIm, Ald², Alk¹ и Alk²-типов

Тип реакционной группы	Олигонуклеотид	Субъединица						ДНК, имп/мин
		β		β'		σ		
		имп/мин	Меченый остаток	имп/мин	Меченый остаток	имп/мин	Меченый остаток	
MeIm	I	1 700	His+Lys	0	—	0	—	0
	II	33 000	His	0	—	0	—	0
	III	580	His+Lys	0	—	0	—	0
	IV	260	Lys	380	Lys	100	—	0
	V	670	»	350	»	1 400	His	0
	VI	290	—	670	—	18 000	—	0
	XIV	7 200	His	0	—	0	—	0
Ald ²	II	3 200	Lys	0	—	0	—	0
	II	10 000	Nucl	0	—	10 000	Nucl	62 000
Alk ¹	III	400	»	0	—	14 000	»	220 000
	IV	6 800	»	0	—	11 000	»	20 000
	V	1 200	»	600	Nucl	2 400	»	6 000
	VI	600	»	1000	»	2 600	»	2 000
Alk ²	II	1 200	»	0	—	1 200	»	88 000

* Степень мечения субъединиц и ДНК определялась измерением радиоактивности вырезанных из геля фрагментов. Данные (имп/мин) приведены с вычетом фона и соответствуют одинаковому количеству РНК-полимеразы. В случае MeIm-производных даны результаты, описанные в работах [2, 3]. Nucl — нуклеофильный остаток неустановленной природы.

Таблица 3

Величины мечения * субъединиц РНК-полимеразы и ДНК с помощью реагентов Ald¹- и Alk³-типов

Тип реакционной группы	Олигонуклеотид	Субъединица						ДНК, степень мечения
		β		β'		σ		
		Степень мечения	Меченый остаток	Степень мечения	Меченый остаток	Степень мечения	Меченый остаток	
Ald ¹	II	160	Lys	0	—	0	—	0
	III	19	»	0	—	0	—	0
	IV	36	»	13	Lys	0	—	0
	V	46	»	63	»	0	—	0
	VI	20	»	29	»	12	—	0
Ald ³	II	80	Nucl	0	—	120	Nucl	2180
	III	110	»	0	—	380	»	960
	IV	340	»	0	—	470	»	770
	V	30	»	0	—	80	»	270
	VI	50	»	60	Nucl	70	»	200

* Степень мечения определяли сканированием автораднограмм, изображенных на рис. 5 и 6. Результаты выражены в условных единицах, пропорциональных площадям пиков на денситограммах и приведены в расчете на одинаковое количество РНК-полимеразы.

Степени мечения от длины олигонуклеотидной части для производных Alk¹- и Alk³-типов сходны, имеют максимум при длине 3—4 звена (рис. 4, дорожки 2—6; рис. 6). К сожалению, пока неясна причина наличия нескольких полос модифицированной ДНК. Возможно, это связано с модификацией разных цепей или же разных нуклеотидных остатков одной цепи. Не исключено также, что множественность полос обусловлена неспецифической модификацией ДНК на первой стадии мечения.

При постановке данной работы мы исходили из того, что если олигонуклеотид, комплементарный промотору, является затравкой синтеза РНК, то тройной комплекс, образуемый с участием этого олигонуклеотида, имитирует тройной комплекс, возникающий при беззатравочной

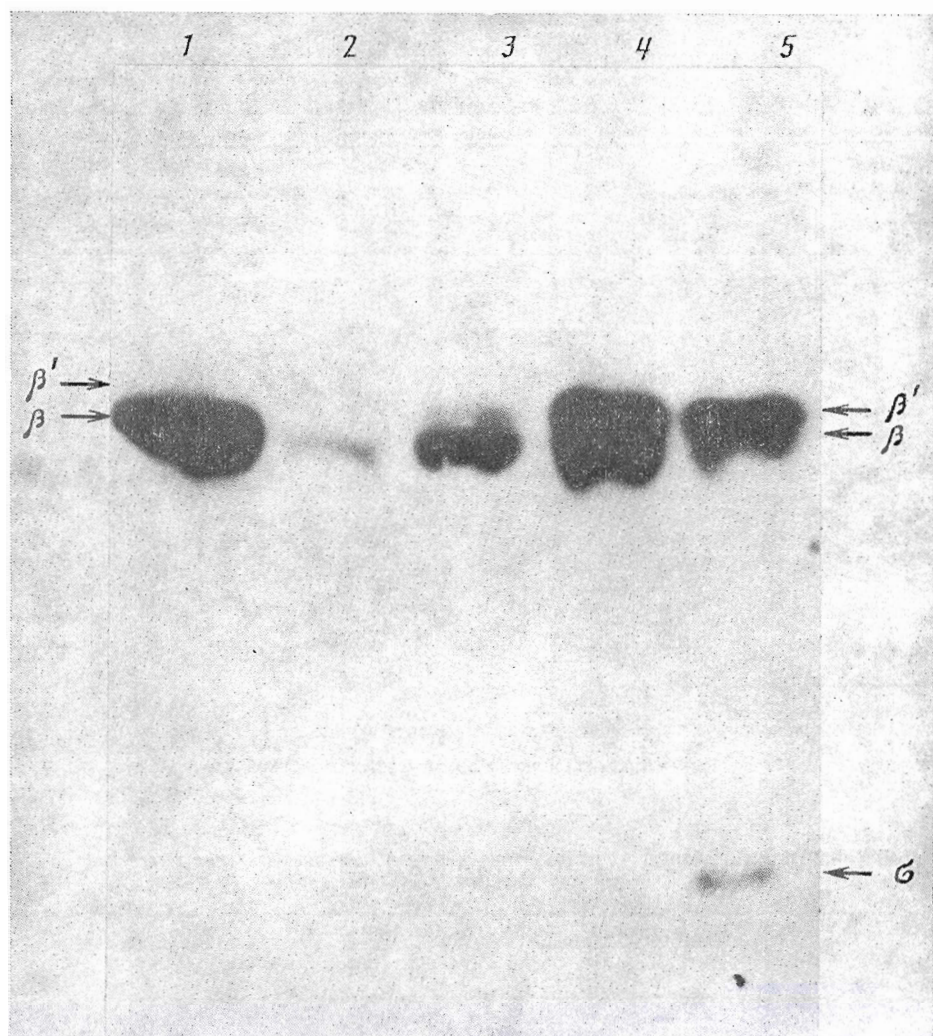


Рис. 5. Аффинное мечение РНК-полимеразы Ald¹-производными олигонуклеотидов (II) (1), (III) (2), (IV) (3), (V) (4) и (VI) (5). Элонгацию проводили [α -³²P]УТР. Электрофорез в 7% ПААГ

транскрипции на стадии синтеза РНК-продукта соответствующей длины. При этом можно полагать, что олигонуклеотид-затравка связывается с участком транскрипционного комплекса, который при беззатравочной транскрипции занят синтезируемой РНК. Таким образом, аффинное мечение с применением реагентов — производных олигонуклеотидов-затравок — может дать информацию о топографии этого участка (так называемого коридора выхода продукта). В данной работе представлены результаты аффинного мечения комплекса [РНК-полимераза·промотор А2] различными реакционноспособными производными олигонуклеотидов, комплементарных этому промотору.

Результаты предварительно проведенных экспериментов по модификации фермент-промоторного комплекса радиоактивными производными олигонуклеотидов свидетельствовали о наличии высокого уровня неспецифической модификации. Это указывало на неприменимость традиционных методов аффинной модификации для изучения коридора выхода продукта в транскрипционном комплексе. Аналогичный вывод был ранее сделан применительно к изучению NTP-связывающего центра РНК-полимеразы [8]. В связи с этим в данной работе был применен недавно разработанный метод аффинного мечения, основанный на эндокаталитическом введении радиоактивной метки селективно в район активного центра [1].

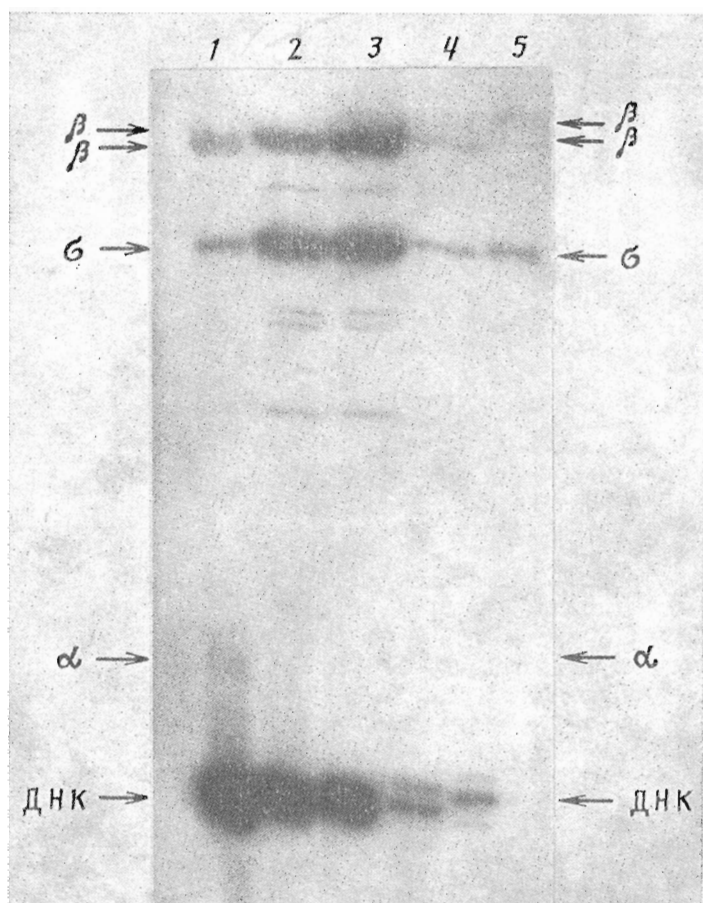


Рис. 6. Аффинное мечение транскрипционного комплекса Alk^3 -производными олигонуклеотидов (II) (1), (III) (2), (IV) (3), (V) (4) и (VI) (5). Элонгацию проводили с помощью $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$. Электрофорез в градиентном (6—20%) ПААГ

Оказалось, что при этом степень мечения не превышает 7% от стехиометрии, что значительно ниже значений, наблюдающихся при использовании традиционных методов аффинной модификации. Причины низкой степени мечения могут быть разными: малая доля ферментативно активных молекул РНК-полимеразы в препарате фермента, искажение конформации белка и/или реагента, вызванное ковалентной фиксацией последнего и препятствующее элонгации с радиоактивным субстратом, и др. Однако очевидно, что независимо от абсолютной степени мечения величины относительных степеней мечения, определенные в данной работе, позволяют делать выводы о наличии и относительной плотности контактов ДНК и субъединиц РНК-полимеразы с 5'-концом олигонуклеотидов различной длины.

В данной работе было применено более 20 аффинных реагентов, различающихся как по размеру олигонуклеотидного адреса, так и по структуре и химической специфичности реакционноспособных группировок. Это позволило впервые получить столь обширную информацию о коридоре выхода продукта (рис. 2—6, табл. 2, 3). Следует отметить, что при использовании реакционноспособных групп с меньшим радиусом действия наблюдается более резкая зависимость степени мечения от длины олигонуклеотида (ср., например, результаты мечения реагентами Alk^1 - и Alk^3 -типов), не приводящая в целом к уменьшению степени мечения. Это указывает на целесообразность использования таких реагентов вместо дальнедействующих.

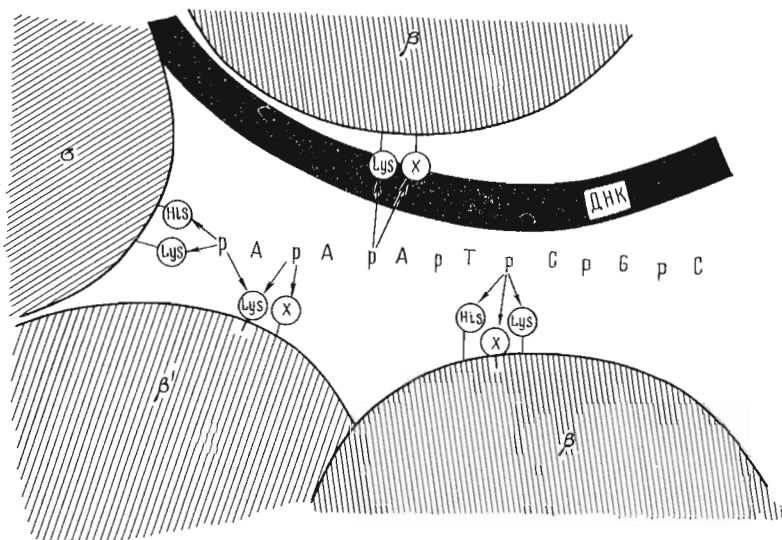


Рис. 7. Топография «коридора выхода продукта», основанная на результатах данной работы

Результаты мечения транскрипционного комплекса реагентами, содержащими альдегидные и алкилирующие группировки, полученные в данной работе, а также результаты, полученные ранее с фосфорилирующими производными этих же олигонуклеотидов [1, 2], позволяют сделать следующие выводы:

1) в организации участка связывания продукта (коридора выхода продукта) принимают участие β -, β' - и σ -субъединицы РНК-полимеразы, а также ДНК;

2) β -субъединица имеет следующие точки контакта с растущей РНК: а) остатки His и Lys на расстоянии 3 нуклеотидных звеньев от активного центра (возможно, роль этих остатков заключается в координации отрицательно заряженных фосфатных групп транскрипта вблизи его 3'-конца); б) остаток Lys на расстоянии 6 нуклеотидных звеньев от активного центра; в) нуклеофильные остатки (отличные от Lys и His) на расстоянии 3 и 5 звеньев от активного центра;

3) β' -субъединица имеет остатки Lys, контактирующие с 5'-концом РНК на расстоянии 7 звеньев, а также другие нуклеофильные остатки на расстоянии 4—5 звеньев от активного центра;

4) σ -субъединица имеет остатки His, Lys, а также, возможно, еще один нуклеофильный остаток, контактирующие с 5'-концом РНК в 7 нуклеотидах от активного центра;

5) ДНК имеет наиболее тесный контакт с 5'-концом РНК на расстоянии 3—4 нуклеотидных остатков от активного центра.

На основании вышеизложенных выводов построена схема коридора выхода продукта (рис. 7).

В последующем представляется необходимым локализовать точки контакта субъединиц РНК-полимеразы и ДНК с РНК-продуктом на известных первичных структурах этих биополимеров.

Экспериментальная часть

В работе использованы 2,2-дипиридилдисульфид (Merck), боргидрид натрия, акриламид, N,N-метиленбисакриламид (Serva), щелочная фосфатаза и фосфодиэстераза змеиного яда (Sigma), 4-(N,N-бис-2-хлорэтиламино)бензальдегид (НИБХ СО АН СССР); 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензилметиламин (гидрохлорид) и 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегид любезно предоставлены Т. М. Ивановой (НИБХ СО АН СССР). $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ — препарат отечественного производства. Промоторный фрагмент ДНК фага Т7 длиной 106 нуклеотидных звеньев, содержа-

щий промотор A2 [9], любезно предоставлен Т. Г. Максимовой (ЛИН СО АН СССР), РНК-полимераза *E. coli* (удельная активность 3000 ед. акт./мг) — препарат производства «Биолар» (Олайне, ЛатвССР).

Синтез олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды (I)—(XIII) синтезировали как описано в работе [4].

Тририбонуклеотид рСрGrC (XIV) получали по методу [10] с некоторыми модификациями. К раствору 5'-О-монометокситритил-2'-О-тетрагидропиранил-N⁴-бензоилцитидина (0,35 г, 0,5 ммоль) в 3 мл абс. пиридина добавляли 3 мл свежеприготовленного 0,2 М раствора *n*-хлорфенилфосфодитриазолида (0,6 ммоль) в абс. диоксане. Через 30 мин к реакционной смеси добавляли 4-диметиламинопиридин (0,06 г, 0,5 ммоль) и 2'-О-тетрагидропиранил-N²-изобутирилгуанозин (0,3 г, 0,75 ммоль), выдерживали 2 ч при 37° С, добавляли 3 мл 5% NaHCO₃ и экстрагировали хлороформом. Остаток после упаривания хлороформного раствора хроматографировали на силанизированном силикагеле (колонка 2 × 20 см) в градиенте концентрации ацетона (50—100%) в воде. Скорость хроматографии 100 мл/ч, объем элюента 400 мл. Выход ((MeO)₂Tr)bzC(Thp)p(ClPh)ibg·(Thp) * 50%. Аналогичным образом был получен бис(хлорфениловый эфир) тринуклеозиддифосфата ((MeO)₂Tr)bzC(Thp)p(ClPh)ibG(Thp)p(ClPh)·bzC(Bz)₂ с выходом 36%. После удаления в стандартных условиях всех защитных групп ионообменной (Polysil CA, градиент 0—0,2 М KН₂РO₄ в 30% СН₃CN) и обращенно-фазовой (Lichrosorb RP-18, градиент 0—20% СН₃CN в 0,05 М LiClO₄) ВЭЖХ и гель-хроматографии получили СрGrC в виде литиевой соли. Его нуклеотидный состав подтверждали путем гидролиза смесью фосфодиэстеразы I (КФ 3.1.4.1) и 5'-нуклеотидазы (КФ 3.1.3.5) из яда кобры с последующим количественным анализом гидролизата обращенно-фазовой микроколоночной хроматографией. 1500Е₂₆₀ СрGrC инкубировали 1 ч при 37° С с 1000 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы (КФ 2.7.1.78) в 25 мМ трис-HCl (рН 8), 15 мМ MgCl₂, 5 мМ АТР (общий объем реакционной смеси 4 мл). После двух последовательных ВЭЖХ (см. выше) рСрGrC выделяли в виде литиевой соли, которую затем переводили в цетавлюновую.

Синтез реагентов. N-(N-Метил-*n*-формилфенил)аминоэтиловые эфиры олигонуклеотидов (Ald¹-реагенты) получали как описано в работе [11] с несколько измененной процедурой выделения. К раствору 5 мг 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегида в 50 мкл диметилформамида добавляли 50 мкл воды, 6 мкл триэтиламина и 250—300 нмоль олигонуклеотида (Li-соль). Смесь инкубировали 30 мин при 95° С, продукт осаждали 500 мкл 2% LiClO₄ в ацетоне и очищали обращенно-фазовой хроматографией. Выход 30—50%.

N-(*n*-Формилфенил)-N-(2-хлорэтил)аминоэтиловые эфиры олигонуклеотидов (Alk¹-реагенты) получали аналогично Ald¹-реагентам, используя 4-(N,N-бис-2-хлорэтиламино)бензальдегид (8 мг) вместо 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензальдегида.

2-Формилфениловые эфиры олигонуклеотидов (Ald²-реагенты) получали через N-метилимидазолиды [6]. К цетилтриметиламмонийной соли олигонуклеотида (250—300 нмоль), растворенной в 100 мкл диметилформамида, добавляли 8 мкл N-метилимидазола, 22 мг 2,2-дипиридилдисульфида и 26 мг трифенилфосфина. Смесь выдерживали 10 мин при 37° С, затем добавляли 30 мкл *o*-оксибензальдегида и 30 мкл триэтиламина, инкубировали 15 мин при 56° С, продукт реакции осаждали 1 мл 2% LiClO₄ в ацетоне и хроматографировали на колонке с Nucleosil C-18.

4-(N-Метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламины олигонуклеотидов (реагенты Alk³-типа) получали с использованием окислительно-восстановительной конденсации. К цетилтриметиламмониевой соли олигонуклеотида (100 нмоль) добавляли 8 мг 4-(N-метил-N-2-хлорэтиламино)бензиламина, 150 мкл диметилформамида, 9,2 мг 2,2-дипиридилдисульфида и 10 мг трифенилфосфина. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре.

* Thp — тетрагидропиранил.

Продукт осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне и очищали обращенно-фазовой хроматографией.

N-Метилимидазолиды олигонуклеотидов (MeIm-реагенты) получали как описано в работах [2, 3].

Полученные реагенты анализировали с помощью микроколоночной обращенно-фазовой хроматографии на колонке с Nucleosil C18 (5 мкм, Machery-Nagel) в градиенте метанола или ацетонитрила, используя хроматограф «Миличром» [12] с многоволновой детекцией. УФ-спектры записывали на приборе Specord UV-VIS (Karl Zeiss, Iena).

Обработку реагентов щелочной фосфатазой проводили в течение 20 мин при 37° С в растворе, содержащем $5 \cdot 10^{-5}$ М реагент, 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl (pH 8,5) и 10 мкг/мл щелочной фосфатазы в объеме 25 мкл. Фосфатазу инактивировали прогреванием при 95° С в течение 10 мин в присутствии 20 мМ EDTA и олигонуклеотидный материал анализировали микроколоночной хроматографией (см. выше).

Фосфодиэстеразный гидролиз производных олигонуклеотидов осуществляли в 30 мкл раствора, содержащего 10^{-4} М производное олигонуклеотида, 20 мМ трис-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl_2 и 0,015 ед. акт./мл фосфодиэстеразы змеиного яда. Смесь инкубировали 30 мин при 37° С и продукты расщепления анализировали обращенно-фазовой хроматографией (градиент метанола 0—70% в 0,05 М Na-ацетате, pH 5).

Кислотный гидролиз реагентов Alk^2 - и Alk^3 -типов проводили в 10 мМ HCl при 56° С в течение 1 ч. Реакционную смесь затем нейтрализовали 2 М трис-основанием до pH 8 и подвергали обращенно-фазовой хроматографии.

Содержание 2-хлорэтиламиногрупп в соединениях Alk -типа определяли реакцией с тиофенолом. Для этого к 10 мкл 10^{-4} М реагента добавляли 1 мкл 0,1 М тиофенолята натрия (pH 10) и инкубировали 1 ч при 56° С. В случае Alk^1 -реагентов 2-хлорэтиламиногруппу предварительно активировали путем обработки 10 мМ боргидридом натрия (20 мин, 37° С). После завершения инкубации с тиофенолом олигонуклеотидный материал осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне и анализировали микроколоночной хроматографией. О содержании 2-хлорэтиламиногрупп судили по степени превращения исходного реагента в продукт алкилирования тиофенола, имеющий меньшую подвижность при обращенно-фазовой хроматографии. Для Alk^1 -реагентов содержание этих групп составляло 98%, для Alk^2 - и Alk^3 -реагентов — не менее 90%.

Определение затравочных свойств олигонуклеотидов. Реакционную смесь, содержащую $2 \cdot 10^{-7}$ М промоторный фрагмент A2, $2 \cdot 10^7$ М РНК-полимеразу, 25 мМ HEPES*-HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl, инкубировали 2 мин при 37° С, добавляли соответствующий олигонуклеотид до концентрации 10^{-5} М и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ до концентрации $3 \cdot 10^{-8}$ М и инкубировали еще 10 мин при 37° С. Нуклеотидный материал осаждали 2% LiClO_4 в ацетоне, осадок растворяли в 5 мкл формамида, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленицианолового голубого, и подвергали электрофорезу в 25% ПААГ ($100 \times 60 \times 0,4$ мм), содержащем 7 М мочевины, 50 мМ трис-борат (pH 8,3) и 10 мМ EDTA. Электрофорез вели при 600 В в течение 1,5 ч и гель авторадииографировали.

Аффинное мечение. Реакционную смесь, содержащую промоторный фрагмент A2 (0,2—0,5 мкМ), РНК-полимеразу (0,2—0,5 мкМ), 25 мМ HEPES-HCl (pH 8), 10 мМ MgCl_2 , 50 мМ NaCl, инкубировали 2 мин, затем добавляли соответствующий реагент (реагенты Alk^1 -типа предварительно инкубировали 20 мин при 37° С в 10 мМ боргидриде натрия) и инкубировали 1 ч при 37° С. В случае реагентов Alk -типа в смесь после этого добавляли боргидрид натрия до 10 мМ и инкубировали 20 мин при 37° С. Затем к смеси добавляли рифампицин до 10^{-4} М и через 5 мин $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ или $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ до $2 \cdot 10^{-7}$ М. После 5 мин инкубации при 37° С реакцию останавливали добавлением $1/4$ объема денатурирующей смеси (5% SDS,

* HEPES — 4-(2-гидроксипирил)-1-пиперазинэтансульфокислота.

5% меркаптоэтанол, 0,1% бромфеноловый синий, 50% глицерин), выдерживали 10 мин при 56° С и подвергали электрофорезу.

Электрофорез аффинно-меченой РНК-полимеразы проводили в ПААГ размером 100 × 60 × 0,4 мм по Лэммли [13]. Концентрация концентрирующего геля 4%; концентрации разделяющего геля указаны в подписях к рисункам. Электрофорез вели 2—3 ч при 10 мА. По окончании электрофореза гель окрашивали кумасси R-250 и/или высушивали и автордиографировали.

Авторы выражают признательность члену-кор. АН СССР М. А. Грачеву за полезные обсуждения при подготовке данной публикации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grachev M. A., Kolocheva T. I., Lukhtanov E. A., Mustaev A. A. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 113—121.
2. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кутявин И. В., Царев И. Г. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1678—1681.
3. Godovikova T. S., Grachev M. A., Kutayvin I. V., Tsarev I. G., Zarytova V. F., Zaychikov E. F. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 166. № 2. P. 611—616.
4. Grachev M. A., Zaychikov E. F., Ivanova E. M., Komarova N. I., Kutayvin I. V., Sidelnikova N. P., Frolova I. P. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 22. P. 8509—8524.
5. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. М. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886—894.
6. Годовикова Т. С., Зарьтова В. Ф., Хилимская Л. М. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 4. С. 7475—7481.
7. Буторин А. С., Власов В. В., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Коневец Д. А., Кутявин И. В., Царев И. Г. // Биоорг. химия. 1987. Т. 13. № 6. С. 845—848.
8. Смирнов Ю. В., Липкин В. М., Овчинников Ю. А., Грачев М. А., Мустаев А. А. // Биоорг. химия. 1981. Т. 6. № 8. С. 1113—1116.
9. Серпинский О. И., Каргиноза Е. А., Микрюков Н. Н., Кравченко В. В., Зайчиков Е. Ф., Максимова Т. Г., Оникиенко А. И., Плетнев А. Г., Митина Ю. Л. // Биоорг. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 840—847.
10. Веняминова А. Г., Овчаренко Г. В., Репкова М. Н., Франк Л. А. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. № 5. С. 1376—1379.
11. Грачев М. А., Лукханов Е. А., Мустаев А. А. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 8. С. 1079—1087.
12. Baram G. I., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltsev V. V., Kuper E. A. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69—90.
13. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию
10.V.1989

I. G. TSAREV, A. A. MUSTAEV, E. F. ZAYCHIKOV, T. Yu. ALIKINA *,
A. G. VENIAMINOVA *, M. N. REPKOVA *

HIGHLY SELECTIVE AFFINITY LABELLING OF *E. COLI* RNA POLYMERASE PROMOTER COMPLEX WITH REACTIVE DERIVATIVES OF OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS OF VARIOUS CHEMICAL SPECIFITIES

Limnological Institute, Siberian Division, Academy of Sciences of the USSR,
Irkutsk:

* Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Academy
of Sciences of the USSR

A technique of highly selective affinity labelling, which includes covalent modification of the enzyme-T7A2 promoter complex with reactive oligonucleotide derivatives and subsequent elongation of the attached oligonucleotide residue with a radioactive substrate was used to study the product-binding site of *E. coli* RNA polymerase. Different oligonucleotides complementary to the T7A2 promoter (with lengths ranging from 2 to 8 residues) containing 5'-terminal phosphorylating, alkylating or aldehyde groups were used for the labelling. The procedure resulted in labelling DNA and β -, β' - or σ -subunits of the enzyme, which are therefore believed to contact with growing RNA in the course of initiation. Consideration of the labelling patterns as a functions of the oligonucleotide's length as well as of the structure and chemical specificity of the reactive groups led to a tentative topographic scheme of the RNA polymerase product-binding region.